

サブタイプ及び種選択的ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) α リガンドの創製

宮地 弘幸

Design and Synthesis of Subtype- and Species-Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) Alpha Ligands

Hiroyuki MIYACHI

Laboratory of Bioorganic Chemistry, Department of Structural Biology, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan

(Received July 14, 2004; Accepted August 17, 2004)

The molecular pharmacological discovery of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) as the master regulator of lipid and lipoprotein homeostasis, and the rapid development of a parallel screening approach to evaluate activity towards other PPAR subtypes (PPAR δ , and PPAR γ) have provided an opportunity to develop novel PPAR α -selective, PPAR α/γ dual, and PPAR pan agonists. This review focuses on the molecular pharmacology of PPAR α , and summarizes our current design, synthesis, and evaluation of subtype-selective PPAR α agonists. The species selectivity of several classes of PPAR α selective agonists in response to *in vitro* PPAR α transactivation activity is also reported. These studies should help us to understand the structure-activity relationships and the mode of interaction between ligands and PPAR α , and also help to create novel therapeutic choices for the treatment of metabolic disorders.

Key words—peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR); PPAR α ; species selectivity

1. はじめに

ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) はステロイド受容体, レチノイド受容体, ビタミン D 受容体などと同様リガンド依存性の転写因子である。これまでに3つのサブタイプ (α , γ , δ) が同定されていて, 特に PPAR α 及び γ に関しては詳細な研究が進展している。¹⁾ PPAR α は肝臓等脂肪酸異化能の高い組織に分布していて, 脂肪酸の代謝や輸送に関連する遺伝子, コレステロールや中性脂肪の代謝に関連する遺伝子発現を制御している。²⁾ PPAR γ は白色脂肪組織や褐色脂肪組織に顕在していて, 脂肪細胞の分化誘導に対して中心的な役割を果たしており, 成熟した脂肪細胞での脂肪の貯蔵を亢進させている。^{3–6)} これに対し PPAR δ は骨格筋を含め各組織に普遍的に発現しているが, その機能に関しては不明な点が多い。しかし最近飢餓や長期間の運動でグルコース代謝から脂肪酸代謝へと代謝経路の方向付けを行う因子, 飢餓時のエネルギー産

生に関する中心的転写因子としての役割が報告された。^{7–10)}

高脂血症は虚血性心疾患や動脈硬化の危険因子である。各種大規模臨床試験の成績はコレステロールを低下させることの重要性はもとより中性脂肪を低下させること, 高密度リポ蛋白質 (HDL) を増加させることなどバランスよい血中脂質改善の重要性を示している。従来より高脂血症治療薬としてスタチン系やフィブラート系薬剤が汎用されている (Fig. 1; 化合物 (1)–(3))。しかしスタチン系薬剤ではトリグリセライドや遊離脂肪酸の低下作用は一般に弱く, 一方フィブラート系薬剤ではコレステロール低下作用は弱い。この従来の高脂血症治療薬の特徴並びにこれまでに判明した PPAR α の脂質代謝調節機構に関する役割及び高脂血症の病態との関わりを考えると, PPAR α を強く活性化し得る化合物の創製が叶えば極めて強力な血中脂質 (コレステロール及び中性脂肪の双方) 低下薬としての医薬用途が期待される。PPAR α をターゲットにした医薬に関しては既にフィブラート系薬剤が汎用されていた。¹¹⁾ しかしフィブラートの作用は弱くまた PPAR

東京大学分子細胞生物学研究所分子構造創生大部門生体有機化学研究分野 (〒113-0032 文京区弥生 1-1-1)
e-mail: miyachi@iam.u-tokyo.ac.jp

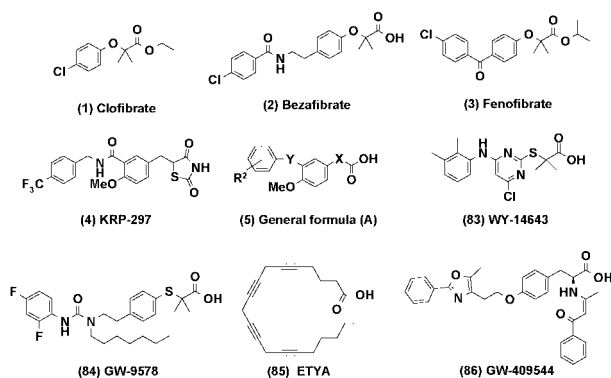
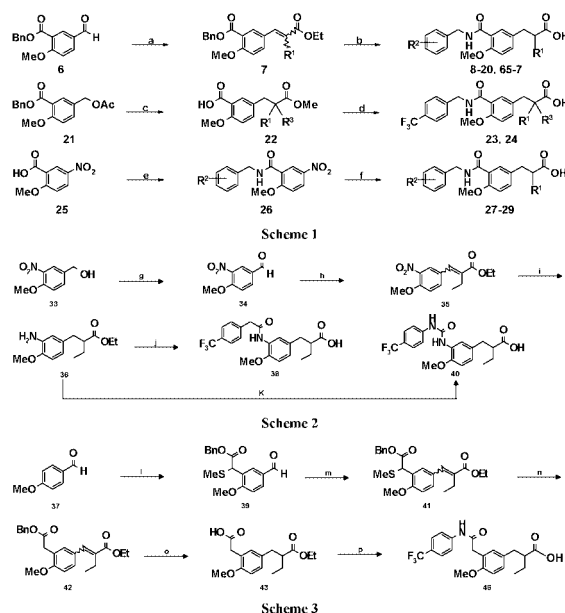


Fig. 1. Chemical Structures of the PPAR Ligands

サブタイプ選択性は乏しかった。筆者らは PPAR γ / α のデュアルアゴニスト KRP-297 (化合物 (4)) に着目した (Fig. 1)。本総説は筆者が 1998 年 4 月から 2004 年 3 月まで杏林製薬株式会社創薬研究所に在籍していた際に得られた研究成果及び関連する杏林製薬での研究を纏めたものである。

2. KRP-297 から KCL の創製

KRP-297 は日本が世界に誇るグリタゾン (チアゾリジン -2,4- ジオン骨格¹²⁾ を有する選択的 PPAR γ アゴニスト) 研究の初期の成果を踏まえて杏林製薬株式会社にて創製された、チアゾリジン -2,4- ジオン骨格を有するにも関わらず PPAR γ のみならず PPAR α にも同等の結合活性、転写活性化作用を示す極めてユニークな化合物である。^{13,14)} KRP-297 の発表以降“デュアルアクション PPAR”という新規作用機構を有するインスリン抵抗性改善薬の創製を目指した創薬研究が今なお精力的に行われているが、それらの大部分はカルボン酸誘導体であり、基本骨格としてチアゾリジン -2,4- ジオン構造を有する高活性 PPAR γ / α デュアルアゴニストは筆者の知る限り KRP-297 が最初の化合物である。筆者らは KRP-297 の PPAR α 活性をさらに向上させ、一方で PPAR γ 活性を低減させる構造展開により、選択的 PPAR α アゴニストの創製が可能であると考えた。KRP-297 は構造上 3 つの部分構造 (酸性残基部分、リンカー部分、疎水性末端部分) に分けて考えることができる。PPAR α に関して各部分構造に関する構造最適化を図るべく Scheme 1 から 6 に示すルートにて Fig. 1 の一般式 (5) で示される各種誘導体を合成し、そのヒト PPAR 転写活性化作用を比較検討した (Tables 1—3)。¹⁵⁾



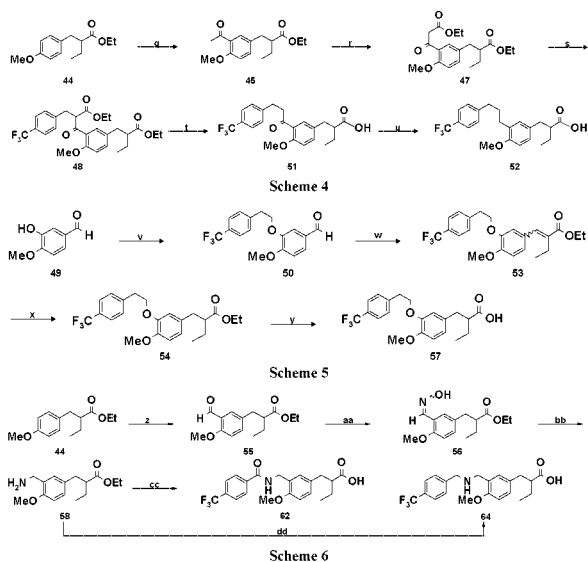
Schemes 1–3. Synthetic Routes to the Phenylpropanoic Acids and Related Compounds

Reagents: a) (EtO)₂POCH(Et)CO₂Et, NaH, THF, b) (1) H₂, 10% Pd-C, EtOH, (2) amine, ClCO₂Et, TEA, CH₂Cl₂, (3) aq-NaOH, EtOH, c) (1) R₂C=C(OTMS)OMe (R=Me or Et), Mg(ClO₄)₂, CH₂Cl₂, (2) H₂, 10% Pd-C, EtOH, d) (1) 4-(CF₃)PhCH₂NH₂, ClCO₂Et, triethylamine, CH₂Cl₂, (2) same as in b), e) same as in a) (2), f) (1) same as in b) (1), (2) NaNO₂, HBr, MeOH-acetone, (3) ethyl acrylate, Cu₂O, (4) NaSR (R=alkyl, phenyl, benzyl), EtOH, (5) same as in b) (3). g) MnO₂, CH₂Cl₂, h) (EtO)₂POCH(Et)CO₂Et, NaH, THF, i) H₂, 10% Pd-C, EtOH, j) (1) 4-(CF₃)PhCH₂CO₂H, EDCI · HCl, CH₂Cl₂, (2) aq-NaOH, EtOH, k) (1) 4-(CF₃)PhNCO, EtOH, (2) same as in j) (2). l) (1) MeSCH(Cl)CO₂Et, TiCl₃, CH₂Cl₂, CCl₄, (2) aq-NaOH, EtOH, (3) PhCH₂Br, K₂CO₃, DMF, m) (EtO)₂POCH(Et)CO₂Et, NaH, THF, n) Zn, AcOH, o) H₂, 10% Pd-C, EtOH, p) (1) 4-(CF₃)PhNH₂, ClCO₂Et, triethylamine, CH₂Cl₂, (2) same as in l) (2).

(Reproduced with permission from American Chemical Society: Design, Synthesis and Evaluation of Substituted Phenylpropanoic Acid Derivatives as Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Activators; Discovery of Potent and Human PPAR α Subtype-Selective Activators. *J. Med. Chem.*, **46**, 3581–3599, 2003.)

2-1. 各部分構造の変換 (ラセミ KCL の創製)

本研究に着手した 1998 年頃はチアゾリジン -2,4- ジオン構造は PPAR γ 活性発現に必須かつ特異的な薬理作用団であると考えられていた。チアゾリジン -2,4- ジオンも酸性残基であり、既存のフィブレートもフェノキシ酢酸誘導体と酸性化合物であることから、化合物 (4) の末端にチアゾリジン -2,4- ジオンではなく、種々の長さのリンカーを有するカルボン酸誘導体を合成すれば PPAR α 選択性を有する化合物が見出せるのではないだろうかと考えた。そこで一連のカルボン酸誘導体やチアゾリジン -2,4- ジオン環以外の環構造を有するカルボン酸バイオアイソステアを合成し (合成法は割愛) 活性評価を行ったところ、エチレン鎖を有するフェニルプロピオ



Schemes 4–6. Synthetic Routes to the Phenylpropanoic Acids and Related Compounds

Reagents: q) AcCl , AlCl_3 , CH_2Cl_2 , r) $(\text{CO}_2\text{Et})_2\text{CO}$, NaH , s) 4- (CF_3) PhCH_2Br , NaH , THF , t) AcOH , c. HCl , u) H_2 , 10% Pd-C , EtOH . v) 4- (CF_3) $\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{P}(\text{Ph})_3$, DEAD , THF , w) $(\text{EtO})_2\text{POCH}(\text{Et})\text{CO}_2\text{Et}$, NaH , THF , x) H_2 , 10% Pd-C , EtOH , y) aq-NaOH , EtOH . z) TiCl_4 , MeOCHCl_2 , CH_2Cl_2 , aa) $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, pyridine , EtOH , bb) H_2 , 10% Pd-C , EtOH , cc) (1) 4- (CF_3) PhCO_2H , ClCO_2Et , triethylamine, CH_2Cl_2 , (2) aq-NaOH , EtOH , dd) (1) 4- (CF_3) PhCH_2Br , K_2CO_3 , DMF , (2) same as in cc) (2).

(Reproduced with permission from American Chemical Society: Design, Synthesis and Evaluation of Substituted Phenylpropanoic Acid Derivatives as Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Activators; Discovery of Potent and Human $\text{PPAR}\alpha$ Subtype-Selective Activators. *J. Med. Chem.*, **46**, 3581–3599, 2003.)

ン酸誘導体 (8) が KRP-297 と同等のヒト $\text{PPAR}\alpha$ 転写活性化作用を示す一方で、 $10\ \mu\text{M}$ の濃度でも明確なヒト $\text{PPAR}\gamma$ 活性を示さないという、まさにヒト $\text{PPAR}\alpha$ 選択性を有する化合物であることが判明した (Table 1).¹⁵⁾ フェニルプロピオン酸構造におけるカルボキシル基とベンゼン環との距離はベンジルチアゾリジン-2,4-ジオンのイミド基とベンゼン環との距離に符号しているものと推測している。次にカルボキシル基の α 位に置換基導入を検討することを計画したが、その際注目していた論文があった。ストックホルム大学の Lundgren らによる、マウス肝臓ペルオキシソームやミトコンドリアのカルニチンアセチルトランスフェラーゼ活性やパルミトイル-CoA 酸化に対する 2-エチルヘキサン酸誘導体の効果に関する 1987 年の *Eur. J. Biochem.* 誌の論文である。¹⁶⁾ $\text{PPAR}\alpha$ のクローニングに関する Isseman と Green の論文が公表されたのが 1990 年であり、¹⁷⁾ Lundgren らは当然 $\text{PPAR}\alpha$ との関連に関して考察のしようもない訳であるが、筆者はこの作

Table 1. Effect of the Acidic Part of the Present Series of Compounds

No.	Structure R	Transactivation ($\text{EC}_{50}\ \mu\text{M}$) ^{a)}		
		$\text{PPAR}\alpha$	$\text{PPAR}\gamma$	$\text{PPAR}\delta$
4	$\text{CH}_2\text{TZD}^b)$	1.0	0.8	ia ^{c)}
8	$(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$	1.3	ia	ia
9	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{Me})\text{CO}_2\text{H}^d)$	0.24	ia	2.8
10	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{Et})\text{CO}_2\text{H}^d)$	0.040	1.0	3.6
11	$\text{CH}_2\text{CH}(n\text{-Pr})\text{CO}_2\text{H}^d)$	0.36	ia	2.4
12	$\text{CH}_2\text{CH}(i\text{-Pr})\text{CO}_2\text{H}^d)$	0.29	ia	ia
13	$\text{CH}_2\text{CH}(n\text{-Bu})\text{CO}_2\text{H}^d)$	1.0	2.5	ia
14	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{Ph})\text{CO}_2\text{H}^d)$	ia	ia	ia
15	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{OMe})\text{CO}_2\text{H}^d)$	0.23	ia	ia
16	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{OEt})\text{CO}_2\text{H}^d)$	1.6	2.8	3.0
17	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{OPh})\text{CO}_2\text{H}^d)$	ia	ia	ia
23	$\text{CH}_2\text{C}(\text{Me})_2\text{CO}_2\text{H}$	2.9	ia	ia
24	$\text{CH}_2\text{C}(\text{Et})_2\text{CO}_2\text{H}$	2.8	ia	ia
27	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{SEt})\text{CO}_2\text{H}^d)$	1.6	2.8	3.0
28	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{SPh})\text{CO}_2\text{H}^d)$	ia	ia	ia
29	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{SCH}_2\text{Ph})\text{CO}_2\text{H}^d)$	ia	ia	ia
30	CO_2H	ia	ia	ia
31	$\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$	ia	ia	ia
32	$(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{H}$	2.2	3.0	ia
	Bezafibrate	>78	>137	>143

a) Compounds were screened for agonist activity on PPAR-GAL4 chimeric receptors in transiently transfected CHO-K1 cells as described. EC_{50} value is the molar concentration of the test compound that causes 50% of the maximal reporter activity. $n=3$. b) KRP-297. Data taken from ref. 10. c) “ia” means inactive at the concentration of $10\ \mu\text{M}$. d) Assayed as a racemate.

(Reproduced with permission from American Chemical Society: Design, Synthesis and Evaluation of Substituted Phenylpropanoic Acid Derivatives as Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Activators; Discovery of Potent and Human $\text{PPAR}\alpha$ Subtype-Selective Activators. *J. Med. Chem.*, **46**, 3581–3599, 2003.)

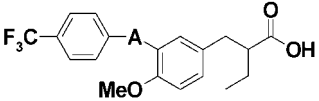
用は多分に $\text{PPAR}\alpha$ を分子標的とした作用であろうと推測した。また、一連の誘導体の活性の強弱の度合いに側鎖のアルキル基が重要な役割を果たしているはずであると推測した。そこでアルキル基を中心にアルコキシル基やアルキルチオ基、フェニル基などを側鎖に有する化合物を合成し活性評価を行った (Table 1)。結果は予想通りであって、各種導入した置換基の中ではアルキル基の形状が最もヒト PPAR 活性に影響を与え、この中ではエチル基体 (10) が最も高活性であった。エチル基より鎖長が長くてもまた短くても活性は低下した。また非チアゾリジン-2,4-ジオン型 $\text{PPAR}\gamma$ アゴニストとして報告のあった SB-213068 誘導体に見られたエトキ

シ基やエチルチオ基を側鎖に有する誘導体 (**16**, **27**) も合成したが、高活性は示さず、シンプルなアルキル基の活性向上に対する有効性が示された。代表的フィブレートであるベザフィブレートのヒト PPAR α 活性化作用の EC₅₀ 値が数十 μ M オーダーであり、化合物 (**10**) は約 2000 倍高活性を示すフルアゴニストであることが判明した。一方、化合物 (**10**) のヒト PPAR γ 活性化作用及びヒト PPAR δ 活性化作用はともに弱く、置換基導入を行ってもヒト PPAR α 選択性が保持されていることを確認した。¹⁵⁾

次にリンカー部分の構造変換体の活性を検討した。リンカー部分に関してはその長さや形状の効果を比較すべくダイバーシティを持たせた誘導体の合成を行った。¹⁵⁾ 結果の一部を Table 2 に示す。長さの因子に関しては炭素数にして 3 炭素分の長さが好適であり (化合物 **10**)、それよりも長くてもまた短くても活性は著しく低下することが判明した (化合物 **18**, **19**)。特に短い場合 (化合物 **18**) には活性は 1/100 以下に低下した。

酸性のカルボキシル基と他端の疎水性置換基との

Table 2. Effect of the Linker Part of the Present Series of Compounds



No.	Structure		Transactivation (EC ₅₀ μ M) ^{a)}		
	R		PPAR α	PPAR γ	PPAR δ
10	CH ₂ NHCO ^{d)}		0.04	1.0	3.6
18	NHCO ^{d)}		6.0	ia ^{c)}	ia
19	(CH ₂) ₂ NHCO ^{d)}		0.74	ia	1.5
20	CH ₂ N(CH ₃)CO ^{d)}		ia	ia	ia
38	CH ₂ CONH ^{d)}		0.13	ia	ia
40	NHCONH ^{d)}		ia	ia	ia
46	NHCOCH ₂ ^{d)}		0.02	ia	ia
51	CH ₂ CH ₂ CO ^{d)}		0.32	7.4	ia
52	CH ₂ CH ₂ CH ₂ ^{d)}		0.86	ia	0.64
57	CH ₂ CH ₂ O ^{d)}		0.68	ia	0.40
62	CONHCH ₂ ^{d)}		0.04	>10	0.12
64	CH ₂ NHCH ₂ ^{d)}		4.9	ia	8.0
	Bezafibrate		>78	>137	>143

a), c), and d) See footnotes of Table 1.

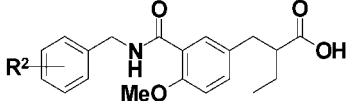
(Reproduced with permission from American Chemical Society: Design, Synthesis and Evaluation of Substituted Phenylpropanoic Acid Derivatives as Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Activators; Discovery of Potent and Human PPAR α Subtype-Selective Activators. *J. Med. Chem.*, **46**, 3581–3599, 2003.)

距離というものが高活性発現に極めて重要な因子であることを示唆するものと考えている。

選択性に関しては、ヒト PPAR α 選択的活性化作用発現にはリンカー中にアミド結合又は逆アミド結合を有することが重要であった (化合物 **10**, **38**, **46**, **62**)。メチレンリンカー体 (化合物 **52**) やエーテルリンカー体 (化合物 **57**) では弱いながらもヒト PPAR α/δ デュアル活性化作用を示した。またアミド結合を有するにも関わらず、アミドメチルリンカーを有する化合物 (**62**) は例外的に強いヒト PPAR α/δ デュアル活性化作用を示した。リンカーの形状によりヒト PPAR サブタイプ選択性が変化する現象は興味深い。

次に末端ベンゼン環上の置換基変換体の活性を Table 3 に示す。種々置換基導入体を合成したが、高いヒト PPAR α 転写活性化作用を示すためには、4 位に疎水性の嵩高い置換基 (CF₃ 基, OCF₃ 基, OC₆H₅ 基) の導入が好適であることが明らかとな

Table 3. Effect of the Substituents Introduced at the Left Benzene Ring



No.	Structure		Transactivation (EC ₅₀ μ M) ^{a)}		
	R		PPAR α	PPAR γ	PPAR δ
65	H ^{d)}		2.3	10.0	ia ^{c)}
66	4-Cl ^{d)}		3.0	ia	ia
67	3-CF ₃ ^{d)}		1.8	ia	ia
10	4-CF ₃ ^{d)}		0.040	1.0	3.6
68	4-OCF ₃ ^{d)}		0.043	ia	0.90
69	2-OCH ₃ ^{d)}		9.4	ia	ia
70	3-OCH ₃ ^{d)}		3.1	n.d.	ia
71	4-OCH ₃ ^{d)}		1.2	ia	6.60
72	2-OPh ^{d)}		ia	ia	ia
73	3-OPh ^{d)}		0.40	6.2	ia
74	4-OPh ^{d)}		0.090	2.4	3.0
75	4-Ph ^{d)}		0.11	4.0	ia
76	4-OCH ₂ Ph ^{d)}		1.5	ia	ia
77	4-CH ₂ CH ₂ Ph ^{d)}		5.6	5.4	ia
78	4-OCH ₂ CH ₂ Ph ^{d)}		2.7	3.0	ia
	Bezafibrate		>78	>137	>143

a), c), and d) See footnotes of Table 1.

(Reproduced with permission from American Chemical Society: Design, Synthesis and Evaluation of Substituted Phenylpropanoic Acid Derivatives as Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Activators; Discovery of Potent and Human PPAR α Subtype-Selective Activators. *J. Med. Chem.*, **46**, 3581–3599, 2003.)

った (化合物 **10**, **68**, **74**). しかし鎖長の長い置換基を導入すると活性は低下傾向を示したので (化合物 **76**, **77**, **78**), この疎水性置換基の相互作用し得る空間に一定の体積要件があることが示唆された. 一連の構造変換の結果, ヒト PPAR α に対して高活性かつ選択的転写活性化作用を示す化合物として化合物 (**10**) を見出すことに成功した.¹⁵⁾

2-2. 光学活性 KCL の創製 化合物 (**10**) には不斉点が 1 つ存在しいづれのエナンチオマーが活性本体であるか特定する必要があった. 化合物 (**10**) は Scheme 7 に示す光学活性オキサゾリジノンイミドに変換すると, シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離可能なジアステレオマーとなり, さらに幸いなことに, 一方のジアステレオマーは非常に結晶性がよかった. そこで再結晶並びにシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて各ジアステレオマーを分離し, オキサゾリジノン部位を脱保護して化合物 (**10**) の各エナンチオマーを得ることができた. ヒト PPAR α 転写活性を測定したところ, (+) 体が活性本体であることを確認した (Fig. 2).^{15,18)}

絶対配置の決定は Scheme 8 に示す方法で行った. すなわち, 絶対配置既知の光学活性 (*R*)-2-ベンジルブタン酸 (化合物 **61**) をエステル化, ニトロ化して 4-ニトロ体とし, 以下還元, Sandmeyer 反応による水酸化, メチルエーテル化により 4-メトキシ体 (化合物 **63**) とした. ついでメトキシ基のオルト位へのホルミル基の導入, Jones 酸化によるカルボキシル基への変換, 4-トリフルオロメチルベンジルアミンによるアミド化, そして加水分解

を行い, 化合物 (*R*)-(**10**) を合成した. この化合物が左旋性を示すことより (-)-(**10**) が *R* 配置, (+)-(**10**) が *S* 配置と決定し, 活性本体である (+) 体を *S* 体 (以後 KCL と記載する) と決定した.¹⁵⁾

次なる課題は工業的合成法の確立である. 本課題に関しては種々検討の結果, Scheme 9 に示すアシルオキサゾリジノンを出発物質とする全 4 工程の合成ルートを確立した.¹⁹⁾

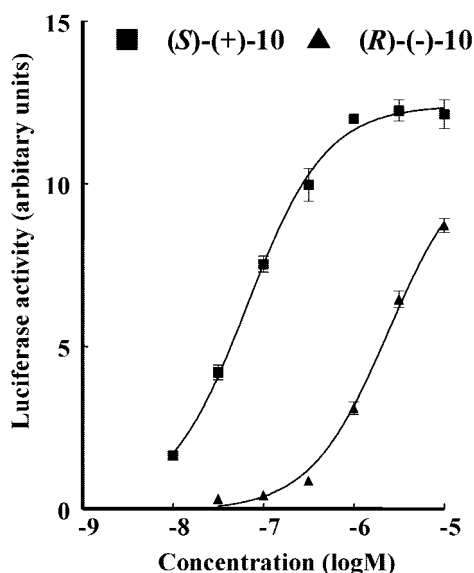
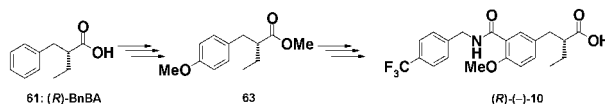
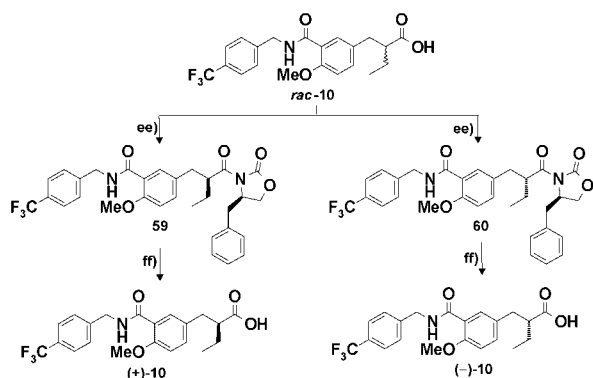


Fig. 2. Dose Response Curves of Each Enantiomer on Trans-activation to PPAR α

(Reproduced with permission from American Chemical Society: Design, Synthesis and Evaluation of Substituted Phenylpropanoic Acid Derivatives as Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Activators; Discovery of Potent and Human PPAR α Subtype-Selective Activators. *J. Med. Chem.*, **46**, 3581–3599, 2003.)

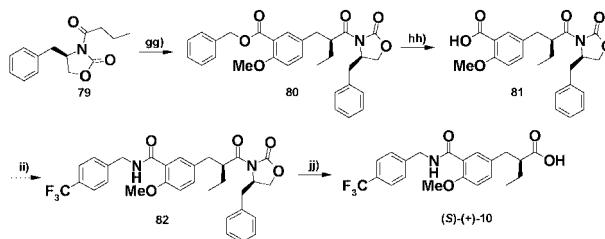


Scheme 8. Synthetic Routes to (*R*)-(-)-10



Scheme 7. Synthetic Routes to Optically Active Phenylpropanoic Acids

Reagents: ee) 1) pivaloyl chloride, NEt₃, THF, 2) 4-(*S*)-benzyloxazolidinone, *t*-BuOK, THF, ff) LiOH, 30% H₂O₂, MeOH.



Scheme 9. Asymmetric Synthetic Routes to (*S*)-10

Reagents: gg) LiHMDS, benzyl 5-bromomethyl-2-methoxybenzoate, THF, hh) H₂, 10% Pd-C, EtOH, ii) 4-(CF₃)PhCH₂NH₂, ClCO₂Et, TEA, CH₂Cl₂, jj) LiOH·H₂O, 30% H₂O₂.

本合成ルートにより光学純度 99% e.e. 以上の光学活性 α -エチルフェニルプロピオン酸誘導体がキログラムスケールにおいても高い通算収率 (約 60%) で製造することが可能となった。

3. KCL の種選択性^{15,22,23)}

ある種のペルオキシゾーム増殖剤が特定の生物種由来の PPAR α に対してより強力な転写活性化作用を示す場合があると言う、言わば“種選択性”が認められることがいくつかの研究グループより報告されていた。例えば生化学実験で汎用されていた PPAR α アゴニストの WY-14643 (化合物 83) は、ヒト PPAR α を用いた場合よりもラット PPAR α を用いた場合に 10 倍高活性を示す。²⁰⁾ GSK 社から最近報告された GW-9578 (化合物 84) も同様にラット PPAR α を用いた場合により高活性を示すことが報告されている。²¹⁾ 一方、ポリインカルボン酸誘導体である 5, 8, 11, 14-エイコサテトライン酸 (ETYA) (化合物 85) は逆の選択性であり、ラット PPAR α を用いた場合よりもヒト PPAR α を用いた場合に 10 倍高活性を示す。²¹⁾ これに対しクロフィブリン酸やフェノフィブリン酸 (それぞれ高脂血症治療薬であるクロフィブラート (化合物 1) 及びフェノフィブラート (化合物 3) の活性代謝物である) は明確な種選択性は示さず、ヒト型とラット型で同等の活性を示すことが判明している。したがって、PPAR α アゴニストに関してはヒト型選択的、ラット型選択的、及び非選択的の 3 種類が存在していることになる (他の生物種由来 PPAR α を用いた実験はこれまでにほとんど報告されていない。前述の ETYA に関してはヒト及びアフリカツメガエル PPAR α で同等の活性を示し、ラット PPAR α では活性が 1/10 に低下することが報告されている。²¹⁾ この種選択性の問題に興味を持ち、KCL の種選択性 (ヒト、イヌ、ラット) が検討された。その結果を Table 4 に示す。¹⁵⁾ KCL の転写活性化作用の EC₅₀ 値はヒト PPAR α リガンド結合領域 (以後 LBD と略記する) を用いた場合には 0.06 μ M, イヌ PPAR α LBD を用いた場合には 0.16 μ M のそれぞれフルアゴニスト、一方ラット PPAR α LBD では 5.2 μ M のパーシャルアゴニストであった。フェノフィブラートも検討したが、ヒト、イヌ、ラットでそれぞれ 41 μ M, 50 μ M, 49 μ M であり、フェノフィブラートの非選択性が確認された。¹⁵⁾

Table 4. Species Differences in the Transactivation of PPAR α Isoforms

Compd.	Transactivation (μ M) ^{a)}		
	Human	Dog	Rat
KCL	0.06	0.16	5.2
Fenofibrate	41	50	49

a) See footnote of Table 1.

(Reproduced with permission from American Chemical Society: Design, Synthesis and Evaluation of Substituted Phenylpropanoic Acid Derivatives as Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Activators; Discovery of Potent and Human PPAR α Subtype-Selective Activators. *J. Med. Chem.*, **46**, 3581–3599, 2003.)

この結果には大変ビックリした。KCL は種選択性を示し、ラット PPAR α LBD を用いた場合よりもヒト並びにイヌ PPAR α LBD を用いた場合にそれぞれ 100 倍及び 30 倍も高活性を示すことが明らかにされた。¹⁵⁾ ここまで高いヒト PPAR α 選択性を示した化合物は筆者の知る限りでは KCL のみである。この *in vitro* の種選択性の結果を反映するかのよう、KCL のラットを用いた高脂血症治療効果はフィブラートよりは強いが、しかし期待したほどには強いものではないことが明らかにされた。¹⁵⁾

この種選択性 (ヒト PPAR α 選択性) の現象は大変興味深く、その理屈を解明することは今後の創薬において有益な一知見を与えうると考えられた。そこで、杏林製薬創薬研究所薬理研究グループによりイヌ PPAR α のクローニング、各種キメラ並びに点変異 PPAR α リガンド結合領域蛋白質の作成及び KCL の反応性解析が詳細になされた。^{22,23)} その結果、KCL のヒト (及びイヌ) 選択的転写活性化作用発現にはヒト (及びイヌ) PPAR α リガンド結合領域のヘリックス 3 部位に存在する 272 番アミノ酸イソロイシンの存在が決定的に重要であることが明らかにされた。^{22,23)}

4. KCL の種選択性発現機構の解析

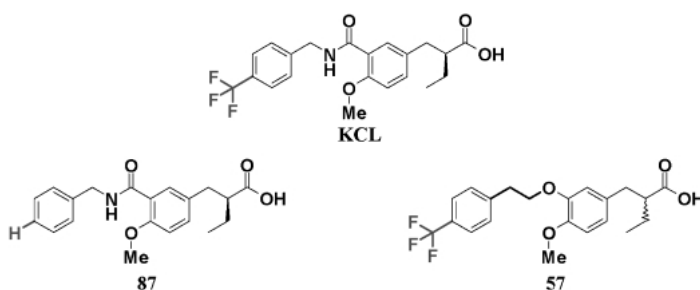
それでは、KCL のどの部分構造が鍵アミノ酸残基である 272 番イソロイシンと相互作用しているのだろうか? ヒト PPAR α LBD とアゴニスト複合体との X 線結晶構造解析結果がいくつか報告されていて、アゴニストの結合にはアゴニスト中の酸性残基部分とヘリックス 5 中のチロシン 314, AF2 ヘリックス中のチロシン 464 との水素結合ネットワークが重要であることが示されていた。^{24–27)} 今注目しているイソロイシン 272 はこれら 2 つのアミノ酸

からは離れて存在しているので、筆者らは KCL のカルボキシル基がチロシン 314, チロシン 464 と水素結合し、疎水性末端の 4-トリフルオロメチル基部分がイソロイシン 272 と結合するアラインメントを推測した。この作業仮説の妥当性を検証するために、野生型ヒト PPAR α LBD 及び hI272F, hT279M (ヒト PPAR α LBD の 272 番イソロイシンをフェニルアラニンに、279 番スレオニンにメチオニンにそれぞれ置換させた点変異体) の各変異 PPAR α LBD に対する KCL の疎水性末端の変換体及びリンカー部分の変換体の転写活性化作用が比較検討された (Table 5).²⁸⁾ その結果、本系統化合物の転写活性化作用は末端ベンゼン環 4 位の置換基に大きく依存することが判明した。無置換体 (87) では野生型ヒト PPAR α 転写活性化作用はマイクロモルオーダーの EC₅₀ 値を示すが、4 位にトリフルオロメチル基を導入すると活性は 40 倍向上した (既に 2-1 節で述べたが、芳香環上の置換位置は 4 位が好ましく、3 位や 2 位では活性は激減する)。これらの化合物の hI272F 変異体に対する活性は一様に低下したが、その活性強度の序列には変化がなかった。¹⁵⁾ KCL の活性は 1/35 となり、無置換体 (87) の活性は 1/20 であり、4 位置換基の嵩が大きい化合物程活性低下の度合いが強いことが明らかにされた。²⁸⁾

このことは KCL の疎水性末端である 4-トリフルオロメチル基とヒト PPAR α のイソロイシン 272 の側鎖とが疎水性相互作用を形成していることを考えると説明がつく。また KCL のヒト PPAR α 選択性と言う現象は唯一 KCL に限ったことではなく、KCL の構造類似体に共通して認められる現象であることも判明した。²⁸⁾

一方、hT279M 変異体に対するこれらの化合物の転写活性化作用は、野生型ヒト PPAR α LBD を用いた場合と比べ大差がない。このことより KCL の疎水性末端部分はヒト PPAR α の 279 番スレオニンとはほとんど相互作用していないことが推測された。²⁸⁾ ところで、リンカー部分の変換体である化合物 (57) の各点変異ヒト PPAR α に対する影響は、KCL や化合物 (87) とは大いに異なっていた。hI272F 変異体と hT279M 変異体のそれぞれを用いた場合、野生型に比べ活性はともに低下したが、その低下の度合いは KCL に比べると hI272F 変異体を用いた場合の低下はわずかであったが、hT279M 変異体を用いた場合には KCL の場合より 2 倍以上低下していた。この理由の 1 つとしてエーテルリンカーは KCL のアミドリンカーに比べ構造のフレキシビリティが高く、リガンド結合部位内において KCL の 4-トリフルオロメチル基と化合物 (57) の

Table 5. Transactivation Assay of KCL Derivatives Using Wild Type- and Chimeric-PPAR α Ligand Binding Domain



Compd.	Transactivation (μM) ^{a)}			Ratio	
	h-Wild	h-I272F	h-T279M	I272F/h-Wild	T279M/h-Wild
KCL	0.0803	2.82	0.309	35.1	3.85
87	3.38	67.6	11.4	20	3.37
57	2.72	33.4	16.1	12.3	5.92

a) Compounds were screened for agonist activity on PPAR-GAL4 chimeric receptors in transiently transfected CHO-K1 cells as described previously. EC₅₀ value is the molar concentration of the test compound that causes 50% of the maximal reporter activity. b) 30% of the maximum transactivation activity was obtained at the concentration of 10 μM .

(Reproduced with permission from Elsevier Science: Analysis of the critical structural determinant (s) of species-selective peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α)-activation by phenylpropanoic acid-type PPAR α agonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 3145-3149, 2003.)

4-トリフルオロメチル基は同一の位置には存在していない可能性が考えられた。

実際、KCL 及び化合物 (57) の 2-エチルフェニルプロピオン酸部分を固定し、他の部分の回転可能な結合部分に関して回転させた場合の化合物のエネルギー計算を検討したところ、KCL と化合物 (57) では 4-トリフルオロメチル基の存在し得る位置は大いに異なることが算出された (Fig. 3).¹⁵⁾

これまでの研究により KCL のヒト (及びイヌ) PPAR α 選択的転写活性化作用発現には KCL の疎水性末端の構造部分とヒト (及びイヌ) PPAR α の 272 番アミノであるイソロイシンとの相互作用が重要であることを明らかにした。それでは KCL はいったいどのような配向でヒト (及びイヌ) PPAR α LBD に結合しているのでしょうか? いくつかの PPAR α アゴニストの X 線結晶構造解析結果が報告されてはいるが、それらと同様の配向なのであるか? モレキュラーモデリングによりその推測を行った。²⁹⁾ X 線結晶構造解析のなされていた GSK 社の GW-409544 (Fig. 1; 化合物 (86)), 以後 GW と略記する) とヒト PPAR α LBD との複合体の構造をテンプレートに用い、³⁰⁾ GW と KCL の共通構造であるフェニルプロピオン酸部分は固定し、KCL の他の自由回転可能な結合に関して回転させ

た場合のエネルギー計算を行い安定コンホマーを算出した (エネルギー極小化計算には Discover 3 を用いた)。ラット PPAR α LBD の三次元構造構築には Biopolymer を用いてヒト PPAR α LBD の X 線結晶構造のアミノ酸置換により構築した。結果を Fig. 4 に示す。PPAR α LBD と KCL とのドッキングの過程で、安定コンホメーションとして、いわゆる“テールダウン”と“テールアップ”の 2 通りのコンホマーの存在が示唆された。“テールダウン”と“テールアップ”の 2 つのコンホマーを取り得ることに限っては、天然不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) と PPAR δ の複合体 X 線結晶解析で EPA が前述の 2 つのコンホメーションを取って結合していることが示されているので可能性としては考えられた。²⁵⁾ しかし、KCL の場合では安定化エネルギーは“テールダウン”と“テールアップ”でそれぞれ -52.605 kcal/mol と -46.718 kcal/mol であって、“テールダウン”コンホマーの方が有利である。また“テールダウン”コンホマーの場合疎水性末端の 4-トリフルオロメチル基は KCL のヒト型選択性発現に重要なヒト PPAR α LBD イソロイシン 272 の近傍に存在し相互作用し得る。一方“テールアップ”コンホマーでは疎水性末端の 4-トリフルオロメチル基はむしろラット型選択性発現に重要なスレオニン 279 の近傍に存在し、ミュレーション実験が説明できない。これらの考察を踏まえ、筆者らは KCL は“テールダウン”のコンホメーションを取っているものと推測している。そしてこのコンホメーションは GW のコンホメーションとは若干異なることを強調したい。GW の場合はその疎水性末端である 2-(5-メチル-2-フェニルオキサゾール-4-イル)-エトキシ基はヘリックス 3, ヘリックス 5, ヘリックス 6 及びヘリックス 7 で形成される結合ポケットのほぼ中央に位置している。しかるに KCL の疎水性末端である 4-トリフルオロメチルフェニル基は同結合ポケットのより深い位置に沈みこんでヘリックス 3 に沿った位置に存在している。このように若干異なった位置に存在していても強い親和性を持って結合し得るのは PPAR α の結合ポケットが極めて広いため (約 1400 Å³; レチノイド受容体の結合ポケットの約 3 倍の広さ) にそれぞれの位置で強い疎水性相互作用ネットワークを形成可能であるからと推測する。

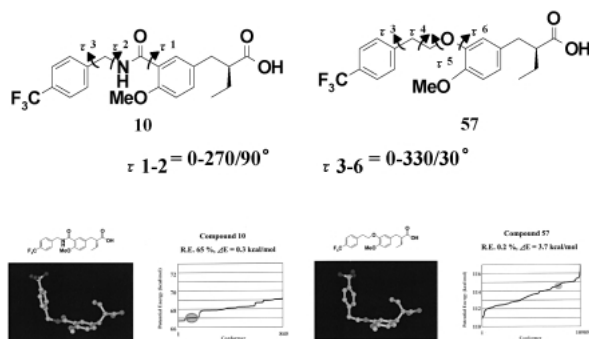


Fig. 3. Chemical Structures and Torsion Angle Definitions of **10** and **57**, together with Values Assigned in the Systematic Search and Schematic Presentation of a Representative “U”-Shaped Conformation of **10** and **57** together with Potential Energy Results from the Systematic Search of the Generated Conformers.

R.E.; relative existence probability versus minimum energy conformer, ΔE ; potential energy difference versus minimum energy conformer, Red circle indicates the area of the “U”-shaped conformer (Reproduced with permission from American Chemical Society: Design, Synthesis and Evaluation of Substituted Phenylpropanoic Acid Derivatives as Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Activators; Discovery of Potent and Human PPAR α Subtype-Selective Activators. *J. Med. Chem.*, **46**, 3581–3599, 2003.)

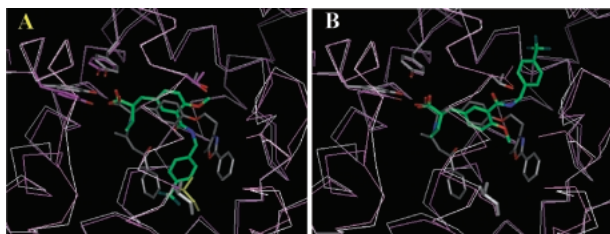


Fig. 4. The Tail-down (A) and Tail-up (B) Conformations of KCL Complexed with Human PPAR α LBD
Ligands are shown in green (KCL), and gray (GW-409544).

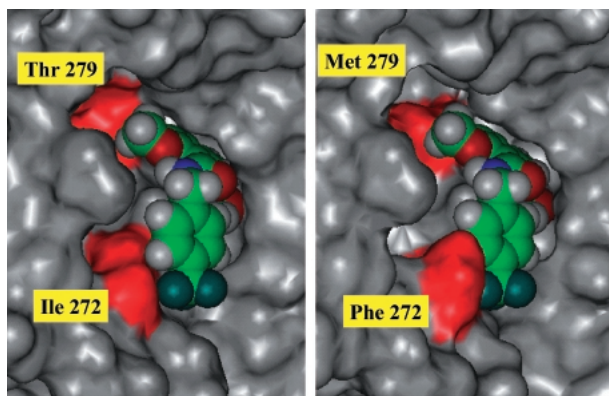


Fig. 5. The Proposed Binding Mode of KCL to Human (Left) and Rat (Right) PPAR α

筆者らの構築したモデルでは KCL の疎水性末端置換基である 4 位トリフルオロメチル基はヒト PPAR α LBD イソロイシン 272 の側鎖 *sec*-ブチル基と疎水性相互作用をし得る位置に存在することが見て取れた。しかるに、ラット PPAR α LBD との結合においては、272 番アミノ酸のフェニルアラニンの側鎖ベンジル基はイソロイシンの側鎖 *sec*-ブチル基と比較するとかなり嵩高く、トリフルオロメチル基は完全にぶつかってしまうことが考えられた。したがって、衝突を避けるようにリガンドはコンホメーション変化し、その形状では強い親和性が得られないので、ラット PPAR α LBD を用いた場合に KCL は低活性しか示さないのであろうと推測する (Fig. 5).²⁹⁾

5. まとめ

チアゾリジン -2,4- ジオン骨格を有するにも関わらず、ヒト PPAR γ のみならずヒト PPAR α にも同等の結合活性、転写活性化作用を示す極めてユニークな KRP-297 をリード化合物とした構造展開による高活性かつサブタイプ選択的さらには種選択的 PPAR α アゴニスト活性を有する KCL の創製過程

を紹介した。KCL は *in vivo* 効果はラットを用いた場合にはフィブラートよりは強力な作用を示したが、それほど強いものではなかった。しかし 272 番アミノ酸がヒト PPAR α と同様 (ヒト型) であるイヌを用いた場合には、ラットでの高脂血症治療効果を示す薬用量の数百分の一程度の極めて低用量から強力な高脂血症治療効果を発揮することが確認された。KCL に関連した化合物が現在海外において臨床第二相試験段階にあり、構造上新規な脂質低下薬として臨床使用され、患者さんにとっての福音となれば創薬研究者としてはこれ以上幸いなことはないし、またこれらの化合物にその資質があることを期待したい。しかし新薬として結実するためのハードルは開発コストを含め年々高くなる一方である。基礎研究段階にあつては創薬ターゲットに対し強い親和性を示す化合物を創製するだけではもはやダメであつて、吸収、分布、トランスポート、代謝、排泄を総合的に見据え、薬物相互作用も少ない薬物の創製を論理的 (勿論 “運” も必要か!) に行う必要性が強く求められているのが現代創薬のトレンドと考える (昨今では SNPs をも考慮した創薬ターゲットの選定の重要性も言われている)。そんな中であつて化合物を直接的に創製し得る存在であるメディシナルケミストの重要性は益々高くなるであろう。著者は今般研究の場を創薬の現場からアカデミアに移したが、多くの若き優秀かつ引きの強い研究者が広い意味でのメディシナルケミストリー領域に参入することを願っている。

謝辞 本研究は文頭にも記載したように、筆者が前職の杏林製薬株式会社創薬研究所に 1998 年 4 月から 2004 年 3 月まで在籍中に、多くの優れた有機合成研究者、薬理研究者、計算化学研究者との共同研究として実施した成果であり、これらの方々に本紙面を借りて感謝の意を表します。また、本総説の執筆の機会を御恵与頂いた東京大学分子細胞生物学研究所・分子構造創生大部門・生体有機化学研究分野橋本祐一教授に感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Staels B., Auwerx J., *Curr. Pharmaceut. Des.*, **3**, 1–14 (1997).
- 2) Aoyama T., Peters J. M., Iritani N., Nakaji-

- ma T., Furihata K., Hashimoto T., Gonzalez F. J., *J. Biol. Chem.*, **273**, 5678–5684 (1998).
- 3) Lambe K. G., Tugwood J. D., *Eur. J. Biochem.*, **239**, 1–7 (1996).
- 4) Elbrecht A., Chen Y., Cullinan C. A., Hayes N., Leibowitz M., Moller D. E., Berger J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **224**, 431–437 (1996).
- 5) Sundvold H., Brzozowska A., Lien S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **239**(3), 857–861 (1997).
- 6) Tai T. A., Jennermann C., Brown K. K., Oliver B. B., MacGinnitie M. A., Wilkison W. O., Brown H. R., Lehmann J. M., Kliewer S. A., Morris D. C., Graves R. A., *J. Biol. Chem.*, **271**, 29909–29914 (1996).
- 7) Amri E. Z., Bonino F., Ailhaud G., Abumrad N. A., Grimaldi P. A., *J. Biol. Chem.*, **270**, 2367–2371 (1995).
- 8) Kliewer S. A., Forman B. M., Blumberg B., Ong E. S., Borgmeyer U., Mangelsdorf D. J., Umesono K., Evans R. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 7355–7359 (1994).
- 9) Oliver Jr. W. R., Shenk J. L., Snaith M. R., Russell C. S., Plunket K. D., Bodkin N. L., Lewis M. C., Winegar D. A., Sznaidman M. L., Lambert M. H., Xu H. E., Sternbach D. D., Kliewer S. A., Hansen B. C., Willson T. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 5306–5311 (2001).
- 10) Tanaka T., Yamamoto J., Iwasaki S., Asaba H., Hamura H., Ikeda Y., Watanabe M., Magoori K., Ioka R. X., Tachibana K., Watanabe Y., Uchiyama Y., Sumi K., Iguchi H., Ito S., Doi T., Hamakubo T., Naito M., Auwerx J., Yanagisawa M., Kodama T., Sakai J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 15924–15929 (2003).
- 11) Forman B. M., Chen J., Evans R. M., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 4312–4317 (1997).
- 12) Sohda T., Mizuno K., Imamiya E., Sugiyama Y., Fujita T., Kawamatsu Y., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **30**, 3580–3600 (1982).
- 13) Nomura M., Satoh H., Kinoshita M., Maeda M., Tsunoda M., Murakami K., Miyachi M., Awano K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 533–538 (1998).
- 14) Murakami K., Tobe K., Ide T., Mochizuki T., Ohashi M., Akanuma Y., Yazaki Y., Kadowaki T., *Diabetes*, **47**, 1841–1847 (1998).
- 15) Nomura M., Tanase T., Ide T., Tsunoda M., Suzuki M., Uchiki H., Murakami K., Miyachi H., *J. Med. Chem.*, **46**, 3581–3599 (2003).
- 16) Lundgren B., Meijer J., DePierre J. W., *Eur. J. Biochem.*, **163**, 423–431 (1987).
- 17) Isseman I., Green S., *Nature (Lond.)*, **347**, 645–650 (1990).
- 18) Miyachi H., Nomura M., Tanase T., Suzuki M., Murakami K., Awano K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 333–335 (2002).
- 19) Nomura M., Tanase T., Miyachi H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 2101–2104 (2002).
- 20) Keller H., Devchand P. R., Perroud M., Wali W., *Biol. Chem.*, **378**, 651–655 (1997).
- 21) Brown P. J., Wineger D. A., Plunket K. D., Moor L. B., Lewis M. C., Wilson J. G., Sundseth S. S., Coble C. S., Wu Z., Chapman J. M., Lehmann J. M., Kliewer S. A., Willson T. M., *J. Med. Chem.*, **42**, 3785–3788 (1999).
- 22) Nagasawa M., Ide T., Suzuki M., Tsunoda M., Akasaka Y., Okazaki T., Mochizuki T., Murakami K., *Biochem. Pharmacol.*, **67**, 2057–2069 (2004).
- 23) Murakami K., Nagasawa M., Suzuki M., First International Symposium on PPARs: From Basic Science To Clinical Applications 2001.
- 24) Nolte C., Wisely G. B., Westin S., Cobb J. E., Lambert M. H., Kurokawa R., Rosenfeld M. G., Willson T. M., Glass C. K., Milburn M. V., *Nature (Lond.)*, **395**, 137–143 (1998).
- 25) Xu H. E., Lambert M. H., Montana V. G., Parks D. J., Blanchard S. G., Brown P. J., Sternbach D. D., Lehmann J. M., Wisely G. B., Willson T. M., Kliewer S. A., Milburn M., *Mol. Cell.*, **3**, 397–403 (1999).
- 26) Cronet P., Petersen J. F. W., Folmer R., Blomberg N., Sjoeblohm K., Karlsson U., Lindstedt E. L., Bamberg K., *Structure*, **9**, 699–706 (2001).
- 27) Xu H. E., Lambert M. H., Montana V. G., Plunket K. D., Moore L. B., Collins J. L., Oplinger J. A., Kliewer S. A., Gampe Jr. R. T. Jr., McKee D. D., Moore J. T., Willson T. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 13919–13924 (2001).
- 28) Miyachi H., Uchiki H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 3145–3149 (2003).

-
- 29) Uchiki H., Miyachi H., *Chem. Pharm. Bull.*, (Tokyo), **52**, 365–367 (2004).
- 30) Xu H. E., Stanley T. B., Montana V. G., Lambert M. H., Shearer B. G., Cobb J. E., McKee D. D., Galardi C. M., Plunket K. D., Nolte R. T., Parks D. J., Moore J. T., Kliever S. A., Willson T. M., Stimmel J. B., *Nature* (Lond.), **415**, 813–817 (2002).